

(51)

Int. Cl. 2:

C 07 G 7/04

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



DT 26 21 311 A 1

(11)

Offenlegungsschrift 26 21 311

(21)

Aktenzeichen:

P 26 21 311.6-41

(22)

Anmeldetag:

13. 5. 76

(43)

Offenlegungstag:

18. 11. 76

(30)

Unionspriorität:

(32) (33) (31)

15. 5. 75 Belgien 156396

12. 8. 75 Belgien 159144

(54)

Bezeichnung:

Verfahren zum Markieren von Proteinen mit Technetium 99m

(71)

Anmelder:

Abramovici, Jean; Ermans, Andre-Marie; Ixelles; Jeghers, Omer,
Neufchateau (Belgien)

(74)

Vertreter:

Grünecker, A., Dipl.-Ing.; Kinkeldey, H., Dr.-Ing.;
Stockmair, W., Dr.-Ing. Ae.E.; Schumann, K., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.;
Jakob, P., Dipl.-Ing.; Bezold, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Pat.-Anwälte,
8000 München

(72)

Erfinder:

gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 28 b PatG ist gestellt

8 MÜNCHEN 22

MAXIMILIANSTRASSE 43

13. Mai 1976

P 10 409-60/co

Jean Abramovici,
127, avenue du Pesage, Ixelles, Belgien
André-Marie Ermans,
2, avenue de la Forêt, Ixelles, Belgien
Omer Jeghers,
95A, rue Féchereux, Neufchâteau, Belgien

Verfahren zum Markieren von Proteinen mit Technetium 99^m

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine injizierbare Lösung zum Markieren von Proteinen mittels Technetium 99^m, bei dem man Pertechnetat reduziert und das reduzierte Pertechnetat mit mindestens einem der Proteine aus der Gruppe Fibrinogen und der Immunglobuline in Berührung bringt, um dieses Protein zu markieren.

In der Literatur sind bereits verschiedene Verfahren zum Markieren von Fibrinogen beschrieben. Diese Angaben beziehen sich insbesondere auf die Markierung von Fibrinogen mit Jod J¹³¹ oder J¹²⁵. Zu diesen bekannten Verfahren gehören das elektrolytische Verfahren, das enzymatische Verfahren, das Chloramin-T-Verfahren und das Jodmonochlorid-Verfahren. Diese Verfahren haben bestimmte Nachteile, die einerseits auf die Verwendung von Radioisotopen mit einer zu langen Halbwertszeit oder von Radioisotopen mit einer für die Markierung von Proteinen nicht geeigneten Halbwertszeit und andererseits auf eine mit den

609847/1013

- 2 -

derzeit auf dem Markt vorhandene Einrichtungen zum Sichtbarmachen nicht verträgliche Energie und auf eine zu starke Irradiation oder auf ein zu starkes Untergrundgeräusch, welches den Nachweis von Thrombosen im Beckenbereich verhindert, zurückzuführen sind.

Hauptsächlich aus diesen Gründen wendet man heute lieber Verfahren zum Markieren mit Technetium 99^m an, wobei das Technetium 99^m die folgenden Hauptvorteile bietet: es ist leicht erhältlich, hat eine kurze Halbwertszeit, ist ein reiner γ -Strahler, dessen Strahlung eine Energie, welche die Sichtbarmachung mit gängigen Apparaturen erlaubt und einen minimalen Irradiationsgrad aufweist.

Die bisher angewendeten Markierungsverfahren basieren jedoch im wesentlichen auf den Methoden der elektrolytischen Markierung. Obgleich in der Literatur auch die Anwendung von Markierungsverfahren mit Technetium 99^m auf chemischem Wege in Gegenwart von Reduktionsmitteln, wie Zinn(II)chlorid oder Komplexe von Ascorbinsäure mit Eisen, erwähnt sind, geht daraus hervor, daß die Ergebnisse, die damit erzielt wurden, niemals sehr zufriedenstellend waren, weil diese Agentien im allgemeinen zu einer Verminderung der Löslichkeit des reduzierten Pertechnetats führen, welche die Markierung des Proteins verhindern kann. Was die Markierungsverfahren mit Technetium 99^m anbetrifft, in denen die Reduktion von Pertechnetat auf elektrolytischem Wege angewendet wird, so machen sie, obgleich sie nach den Angaben in der Literatur die oben genannten Nachteile der bisher bekannten chemischen Markierungsverfahren nicht aufweisen, und häufig die Erzielung einer ziemlich selektiven Markierung des Proteins erlauben, die Verwendung eines komplizierten und kostspieligen Materials erforderlich, da die Elektrolyse im allgemeinen mit Zirkoniumelektroden durchgeführt wird.

- 3 -

609847/1013

Es wurde nun sehr überraschend erfindungsgemäß festgestellt, daß die Verfahren zur Markierung von Proteinen auf chemischem Wege mit Technetium 99^m in Gegenwart von Reduktionsmitteln unter bestimmten Bedingungen außerordentlich vorteilhaft sein können gegenüber den bekannten Markierungsverfahren, insbesondere gegenüber den elektrolytischen Markierungsverfahren, sowohl was die Selektivität der Markierung als auch was die Ausbeute und die Stabilität derselben anlangt.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein wirtschaftliches Verfahren anzugeben, welches die Herstellung einer injizierbaren Lösung eines Proteins der oben genannten Gruppe erlaubt, das mittels Technetium 99^m markiert ist, welches erlaubt, sowohl die sehr vorteilhaften Eigenschaften des Technetiums als Isotopenindikator (Tracer) vollständig auszunutzen als auch eine Selektivität und Stabilität der Markierung sowie eine Wirksamkeit der Bindung des Technetiums an das Protein zu erzielen, die besser sind als diejenigen, die mit den bisher bekannten Markierungsverfahren erzielbar waren.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Markieren von Proteinen mittels Technetium 99^m , bei dem man Pertechmetat reduziert und das reduzierte Pertechmetat mit mindestens einem der Proteine aus der Gruppe Fibrinogen und der Immunglobuline in Berührung bringt, um eine Markierung des Proteins zu erzielen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Reduktion des Pertechmetats in Gegenwart eines Reduktionsmittels bei einem pH-Wert zwischen 11 und 12 durchführt und daß man die dabei erhaltene Mischung, die das mit Technetium markierte Protein enthält, einer Reinigung unterwirft, welche die Eliminierung eventueller Abbauprodukte dieses Proteins sowie des nicht-fixierten Technetiums erlaubt.

Erfindungsgemäß wird die Reduktion des Pertechmetats in Gegenwart eines Reduktionsmittels bei einem pH-Wert zwischen 11 und

609847/1013

12 durchgeführt und die dabei erhaltene Mischung, die das mit Technetium markierte oben genannte Protein enthält, das durch Inberührungbringen des reduzierten Technetiums mit dem Protein hergestellt worden ist, wird einer Reinigung unterworfen, welche die Eliminierung der gegebenenfalls vorhandenen Abbau- produkte dieses Proteins sowie des nicht-fixierten Technetiums erlaubt.

Zweckmäßig besteht die Reinigung darin, daß man aus diesem Protein die Substanzen eliminiert (entfernt), die ein Molekulargewicht von weniger als 100 000 aufweisen. Gemäß einer besonders vorteilhaften Ausführungsform wird die Reduktion des Pertechnetats bei einem pH-Wert in der Größenordnung von 11,6 durchgeführt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das in physiologischem Serum enthaltene Pertechnetat durch Zugabe einer Lösung von Essigsäure und Zinn(II)chlorid als Reduktionsmittel und anschließende Zugabe einer Base, um den pH-Wert auf den gewünschten Wert einzustellen, reduziert.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine injizierbare Lösung, die mindestens ein Protein aus der Gruppe Fibrinogen und der Immunglobuline enthält, das mittels Technetium 99^{m} markiert ist und nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellt wurde.

Weitere Vorteile, Merkmale und Einzelheiten der Erfindung gehen aus der nachfolgenden Beschreibung von einigen beispielhaften vorteilhaften Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Bezugnahme auf die beiliegenden Zeichnungen hervor. Dabei zeigen:

Fig. 1 ein Diagramm, das durch Chromatographie erhalten wurde, welches auf der Abszisse die verschiedenen Fraktionen einer mit Technetium 99^{m} markiertes Fibrinogen enthaltenden Lösung und auf der Ordinate die Radiokaktivität dieser Fraktionen zeigt;

609847/1013

- Fig. 2 ein Diagramm, das durch Chromatographie erhalten wurde, welches auf der Abszisse die erhaltenen verschiedenen Fraktionen einer mit Technetium 99^m markiertes Fibrinogen enthaltenden Lösung und auf der Ordinate die optische Dichte dieser Fraktionen angibt;
- Fig. 3 das vergrößerte Bild einer elektrostatischen Darstellung, welche die Radioaktivitätszonen zeigt, die der Fixierung des Technetium 99^m -Pertechnetats in den 19 Tage nach der Injektion des Freund-Adjuvans und von 500μ Ci von 99^m TcO_4^- erreichten Zonen der rheumatoiden Arthritis des Schwanzes und der Pfote einer Ratte entsprechen;
- Fig. 4 ein vergrößertes Bild einer elektrostatischen Darstellung, welche die Radioaktivitätszonen zeigt, die der Fixierung des Technetium 99^m -Fibrinogens in den 19 Tage nach der Injektion der gleichen Dosis des Freund-Adjuvans wie sie für die Erzeugung des in der Fig. 3 dargestellten Bildes verwendet worden ist, und von 500μ Ci von 99^m Tc -Fibrinogen erreichten Zonen der rheumatoiden Arthritis des Schwanzes und der Pfote einer Ratte entsprechen.

Das erfindungsgemäße Verfahren betrifft die Herstellung einer injizierbaren Lösung von Fibrinogen oder Immunoglobulinen, die mittels Technetium 99^m markiert worden sind, als Isotopenindikator (Tracer). Dieses komplexe Radioisotop eignet sich besonders gut in der spezifischen Radiodiagnostik und zur Früherkennung von inflammatorischen Erkrankungen des Bindegewebes, wie z.B. unter anderem der rheumatoiden Polyarthrit, der Gefäßthrombosen und von malignen Tumoren, insbesondere solchen der Leber und des Gehirns. Unter "rheumatoiden Polyarthrit oder Arthritis" ist auch "Arthritis deformans" zu verstehen.

609847/1013

Zweckmäßig verwendet man lyophilisiertes Fibrinogen menschlichen Ursprungs, das Menschen injiziert werden kann und dessen koagulierbare Fraktion sich auf etwa 90 % beläuft. Darüber hinaus ist dieses Fibrinogen steril und frei von dem Australien-Antigen und Fieber erzeugenden Stoffen. Es wird in lyophilisierter Form in Gegenwart von Natriumsalzen (basischen Salzen) aufbewahrt.

Bei dem verwendeten Isotopenindikator (Tracer) handelt es sich vorzugsweise um steriles und apyrogenes 99^mTc -Pertech-netat (NaTcO_4). Bevor das Pertechnetat mit dem zu markierenden Protein, z.B. Fibrinogen, in Berührung gebracht wird, wird es reduziert. Es ist nämlich allgemein bekannt, daß das in Form von 99^mTcO_4^- erhaltene 99^mTc vorher zu dem Oxydationszustand 4+ oder 5+ reduziert werden muß, bevor es sich an irgendein Molekül bindet.

Die Auswahl des pH-Wertes ist diesbezüglich sehr wichtig und erfindungsgemäß arbeitet man bei einem pH-Wert in der Größenordnung von 11 bis 12, vorzugsweise bei 11,6. Es ist absolut unerlässlich, den pH-Wert innerhalb dieses Bereiches zu halten. Wenn man sich nämlich davon entfernt, so wurde festgestellt, daß überraschenderweise sich die Wirksamkeit der Bindung des reduzierten Technetiums an das Protein deutlich vermindert. Als Reduktionsmittel verwendet man vorzugsweise Zinn(II)-chlorid. Das reduzierte Technetium bindet sich dann, wenn es mit dem Fibrinogen in Berührung gebracht wird, an die Tyrosylgruppen des Fibrinogenmoleküls.

Das lyophilisierte Fibrinogen wird in sterilem und pyrogenfreiem Wasser gelöst und anschließend einer Dialyse unterworfen, um die oben genannten Natriumsalze abzutrennen. In einer darauffolgenden Stufe wird das reduzierte Pertechnetat, beispielsweise durch Rühren, mit dem gelösten Fibrinogen in intensiven

609847/1013

Kontakt gebracht, um die Markierung des Fibrinogens zu bewirken. Die auf diese Weise erhaltene Mischung, die das gelöste Fibrinogen und das reduzierte Pertechnetat enthält, wird anschließend vorzugsweise durch Zugabe einer wäßrigen Lösung von Natriumcitrat und Zitronensäure auf einen pH-Wert zwischen 7 und 8 gebracht. Ein pH-Wert in der Größenordnung von 7,4 ist besonders geeignet.

Es ist auch möglich, eine Markierung des lyophilisierten Fibrinogens ohne Durchführung der oben genannten Dialyse zu erzielen. Man geht dabei wie oben angegeben vor, wobei man die das gelöste Fibrinogen und das reduzierte Pertechnetat enthaltende Mischung auf einen pH-Wert zwischen 7 und 8, vorzugsweise auf 7,4, bringt, beispielsweise ebenfalls durch Zugabe einer wäßrigen Lösung von Natriumcitrat und Zitronensäure. Zu diesem Zweck werden erfindungsgemäß die Reduktion des Pertechnetats, das Inberührungbringen des reduzierten Pertechnetats mit dem gelösten Fibrinogen und die Senkung des pH-Wertes der Mischung auf einen Wert zwischen 7 und 8 vorzugsweise unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Der Stickstoff nimmt nämlich die Stelle des atmosphärischen Sauerstoffs ein und verhindert jede Oxydation oder Rückoxydation der Bestandteile in Gegenwart insbesondere des reduzierten Pertechnetats.

Erfindungsgemäß unterwirft man die so erhaltene Mischung, die mit Technetium markiertes Protein enthält, einer Reinigung, um eventuelle Abbauprodukte dieses Proteins sowie das an letzterem nicht-fixierte Technetium zu eliminieren. Diese Reinigung besteht vorzugsweise darin, daß man von dem markierten Protein die Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 100 000 und gegebenenfalls weniger als 300 000 abtrennt, indem man die Mischung durch eine geeignete Membranschicht, welche die Substanzen mit einem Molekulargewicht ober-

halb der oben angegebenen Werte zurückhält. So verwendet man beispielsweise zum Zurückhalten der Substanzen mit einem Molekulargewicht von mehr als 100 000 zweckmäßig eine Amicon-Zelle, Modell 12, mit einer Membran vom Typ XM 100A.

Durch eine erste Reinigung eliminiert man zweckmäßig das freie Technetium und das an Moleküle, deren Molekulargewicht unterhalb 100 000 liegt, gebundene Technetium und durch eine darauffolgende zweite Reinigung eliminiert man alle Moleküle, deren Molekulargewicht unterhalb 300 000 liegt. In bestimmten Fällen, beispielsweise dann, wenn man die Markierung des lyophilisierten Fibrinogens ohne Durchführung der Dialyse durchführt, ist es zweckmäßig, vor der oben genannten Reinigung die kolloidalen Teilchen und/oder Niederschläge, wie z.B. die Teilchen von ausgefallenem Zinn, die während der Senkung des pH-Wertes der das gelöste Fibrinogen und das reduzierte Pertechetat enthaltenden Mischung auftreten, abzutrennen. Zum Zurückhalten dieser Teilchen verwendet man beispielsweise ein Milliporen-Filter mit einem Porendurchmesser von 0,22 μ .

Durch verschiedene Kontrollverfahren, wie z.B. die Säulenchromatographie und die Immunoelektrophorese, ist es möglich, festzustellen, daß das Reinigungsverfahren eine Eliminierung der Mehrzahl der Abbauprodukte und des freien Technetiums garantiert. Es wurde festgestellt, daß in der erfindungsgemäßen Endlösung das Technetium 99^m zu etwa 90 % an einem Fibrinogen-Molekül fixiert ist und das auf eine sehr reproduzierbare Weise, während die beiden aufeinanderfolgenden Reinigungen in bestimmten Sonderfällen die Herstellung einer Lösung von mit Technetium markiertem Fibrinogen erlauben, in der die Menge des an einem Fibrinogenmolekül fixierten Technetiums mindestens 98 % beträgt.

Diesbezüglich sei festgestellt, daß mit den bisher bekannten Markierungsverfahren, wie bereits weiter oben angegeben, eine

609847/1012

Markierung mit einer ebenso hohen Ausbeute nicht erzielt werden kann, da die dabei erzielbaren Ausbeuten in der Größenordnung von 55 bis 70 % liegen.

Die beiden beiliegenden Diagramme zeigen die Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Reinigungsverfahrens und erlauben die Feststellung, daß es sich bei dem markierten Produkt um das Fibrinogen handelt, und das auf eine sehr selektive Weise.

Die beiden folgenden Beispiele, in denen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beschrieben sind, dienen der weiteren Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens, es sei jedoch darauf hingewiesen, daß die Erfindung keineswegs darauf beschränkt ist.

Beispiel 1

Reduktion des Pertechnetats

10 mCi Pertechnetat, enthalten in 2 ml physiologischem Serum, werden durch Zugabe von 1 ml einer wäßrigen Lösung, die auf 100 ml 20 µl 96 %ige Essigsäure und 10 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ enthält, einerseits und von 0,3 ml 0,1 n NaOH, um den pH-Wert auf 11,6 zu bringen, andererseits reduziert.

Konditionierung des Fibrinogens

Man löst 1 g lyophilisiertes Fibrinogen in 100 ml sterilem und pyrogenfreiem Wasser. Man dialysiert das gelöste Fibrinogen 18 Stunden lang bei 4°C in Dialysesäcken vom Typ Visking 1-8/32" gegen eine 0,6 %ige NaCl-Lösung. Man teilt das gelöste Fibrinogen in aliquote Anteile zu 2 ml auf, die man bei -20°C in Fläschchen aufbewahrt.

609847/1013

Markierung nach der Erfindung

2 ml Fibrinogen werden 15 Minuten lang bei Umgebungstemperatur mit der das reduzierte Technetium enthaltenden Lösung gerührt. Anschließend senkt man den pH-Wert der dabei erhaltenen Mischung durch Zugabe der erforderlichen Menge einer Pufferlösung, die 10 ml 0,1 M Natriumcitrat und 0,5 ml 0,1 M Zitronensäure enthält, bis auf 7,4.

Reinigung des Fibrinogens

Das nicht-fixierte Technetium und die eventuellen Abbauprodukte werden durch Hindurchleiten durch eine Amicon-Zelle, Modell 12, mit einer Membran vom Typ XM 100A eliminiert.

Endkontrolle der Lösung des markierten Fibrinogens

Vor der Injektion wird das erhaltene Endprodukt getestet, um die Sterilität und die Abwesenheit von pyrogenen Materialien zu gewährleisten.

Beispiel 2

Reduktion des Per Technetats

Man verfährt wie in Beispiel 1, wobei man unter einer Stickstoffatmosphäre arbeitet.

Konditionierung des Fibrinogens

Man löst 1 g lyophilisiertes Fibrinogen in Gegenwart von Natriumsalzen in 100 ml sterilem und pyrogenfreiem Wasser. Man unterteilt das gelöste Fibrinogen in aliquote Anteile zu 2 ml, die man bei -20°C in Fläschchen aufbewahrt.

Erfindungsgemäße Markierung

2 ml Fibrinogen werden unter Stickstoff und bei Umgebungstemperatur 15 Minuten lang mit der das reduzierte Technetium enthaltenden Lösung gerührt. Man senkt anschließend den pH-Wert der gebildeten Mischung durch Zugabe der erforderlichen Menge einer 10 ml 0,1 M Natriumcitrat und 0,5 ml 0,1 M Zitronensäure enthaltenden Lösung von einem Anfangswert von 9,6 auf 7,4, stets unter einer Stickstoffatmosphäre.

Abtrennung der kolloidalen Teilchen und/oder Niederschläge, die während der Senkung des pH-Wertes der Mischung auftreten - - -

Die eventuellen Kolloide und das ausgefallene Zinn werden durch Durchlaufenlassen der Mischung durch ein Milliporen-Filter mit einem Porendurchmesser von 0,22 μ abgetrennt.

Erfindungsgemäße Reinigung des Fibrinogens

Man verfährt wie in Beispiel 1.

Endkontrolle der Lösung des markierten Fibrinogens

Vor der Injektion testet man das Endprodukt, um die Sterilität und die Abwesenheit von pyrogenem Material zu gewährleisten.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich auch zum Markieren der Immunglobuline (IgG, IgA, IgM) mittels Technetium. Wie bereits oben angegeben, wurde die Markierung von Fibrinogen und der Immunglobuline entwickelt für die spezifische Diagnostik und die Früherkennung einer bestimmten Anzahl von Erkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Polyarthrititis, der Gefäßthrombosen und der malignen Tumoren, insbesondere der Tumoren der Leber und des Gehirns. Diese Methode erlaubt den Nachweis von Erkran-

609847/1013

kungen der Organe durch Sichtbarmachung mittels einer γ -Szintillationskamera.

Nachfolgend ist ein Vergleichsversuch beschrieben, welcher die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens (^{99m}Tc -Fibrinogen) gegenüber dem Verfahren, in dem $^{99m}\text{TcO}_4^-$ verwendet wird, der Isotopenindikator (Tracer), wie er üblicherweise für die Diagnose von Gelenkentzündungserkrankungen bei rheumatoïder Arthritis mit dem Freund-Adjuvans bei der Ratte angewendet wird.

Es ist bekannt, daß das histologische Krankheitsbild der rheumatoïden Arthritis durch eine vorzeitige Ablagerung von Fibrin auf der Synovialmembran charakterisiert ist, um die herum sich Zellelemente anreichern, die zur Bildung des Pannus führen. In verschiedenen Entwicklungsstadien der Arthritis nach der Injektion des Adjuvans wird eine gleiche Menge des einen oder des anderen dieser beiden Isotopenindikatoren (Tracer) zwei Gruppen von Ratten injiziert. Die Entwicklung der Untersuchungen ist in der nachfolgenden Tabelle angegeben:

Tabelle

1. Gruppe von drei Ratten + Freund-Adjuvans

500 μCi $\text{Tc}^{99\text{m}}\text{O}_4^-$									
----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
0	3	6	9	12	15	17	21	Tage	
500 μCi Fibrinogen- $\text{Tc}^{99\text{m}}$									

2. Kontinuierliche Aufzeichnung der Radioaktivität innerhalb von 30 oder 60 Minuten.

3. Auswahl der interessierenden Zonen.

4. Berechnung der Aktivitätsverhältnisse:
 - a) vollständige Pfote/vollständiger Körper
 - b) aktive Zone/vollständige Pfote
 - c) aktive Zone/inaktive Zone
5. Vergleich dieser Verhältnisse nach 5 Minuten und nach 30 Minuten.
6. Statistische Methode: "t in Paaren".

Die Analyse der Ergebnisse, so wie sie insbesondere aus den Fig. 3 und 4 der beiliegenden Zeichnungen ersichtlich sind, erlaubt die folgenden Schlußfolgerungen:

- a) Die Verteilung des 99^mTcO_4^- und des 99^mTc -Fibrinogens in den erkrankten Gelenken ist vollkommen verschieden: homogen für das 99^mTcO_4^- , wie aus der Fig. 3 der beiliegenden Zeichnungen ersichtlich, worin eine einzige Hyperfixierungszone des Technetium 99^m in der Pfote und in dem Schwanz der Ratte erkennbar ist, und heterogen für 99^mTc -Fibrinogen, wie aus der Fig. 4 ersichtlich, woraus zwei gut unterscheidbare Hyperfixierungszonen in der Pfote und eine starke Fixierung in dem Schwanz hervorgehen. Dieser Unterschied ist in erster Linie auf das verschiedene Verhalten dieser beiden Isotopenindikatoren (Tracer) zurückzuführen.

Die Anreicherung des 99^mTcO_4^- in einem erkrankten Gelenk ist das Ergebnis, das mit zwei Mechanismen zusammenhängt: in einer ersten Phase ist die Anreicherung proportional zu dem Grad der Entzündung (intravasculärer Mechanismus), in einer zweiten Phase diffundiert der auf den Blutproteinen fixierte Isotopenindikator (Tracer) in die umgebenden Gewebe (extravasculärer Mechanismus).

609847/1013

Das Tc 99^m -Fibronogen diffundiert nicht in die umgebenden Gewebe. Sein Grad der Fixierung ist proportional zu der auf der erreichten Synovialmembran abgelagerten Fibrinmenge.

b) Der Vergleich des Verhältnisses (erkrankte Zone)/(nicht-erkrankte Zone) nach 5 Minuten und nach 30 oder 60 Minuten zeigt für das 99^mTcO_4^- eine Abnahme dieses Verhältnisses mit dem Ablauf der Zeit, dagegen eine Zunahme dieses Verhältnisses für das 99^mTc -Fibrinogen.

Die statistische Methode "t in Paaren" ist äußerst signifikant:

<u>ΔR^* bei t = 5 Minuten und 30 Minuten</u>	
99^mTcO_4^-	99^mTc -Fibrinogen
$p < 0,001$	$0,1 < p < 0,05$

c) Die Anreicherung des 99^mTcO_4^- ist das Ergebnis eines Gefäß-erweiterungsprozesses im Rahmen einer nicht-spezifischen Entzündung, während das 99^mTc -Fibrinogen eine Fixierungsspezifität aufweist, die an die Anwesenheit einer Fibrinablagerung auf der Synovialmembran gebunden ist.

d) Das 99^mTc -Fibrinogen erlaubt als Isotopenindikator (Tracer) die Frühdiagnose und spezifische Diagnose von rheumatoiden Arthritis (Arthritis deformans).

e) Das 99^mTc -Fibrinogen erlaubt andererseits eine objektive Beurteilung der Entwicklungstendenz der Erkrankung.

Die Erfindung wurde zwar vorstehend unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsformen näher erläutert, es ist jedoch für den Fachmann selbstverständlich, daß sie darauf keineswegs beschränkt ist, sondern daß diese in vielfacher Hinsicht abgeändert und modifiziert werden können, ohne daß dadurch der Rahmen der vorliegenden Erfindung verlassen wird.

Patentansprüche:

609847/1013

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zum Markieren von Proteinen mittels Technetium 99^m , bei dem Pertechmetat reduziert und das reduzierte Pertechmetat mit mindestens einem der Proteine aus der Gruppe Fibrinogen und der Immunglobuline in Berührung gebracht wird, um eine Markierung dieses Proteins zu erzielen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reduktion des Pertechmetats in Gegenwart eines Reduktionsmittels bei einem pH-Wert zwischen 11 und 12 durchführt und daß man die dabei erhaltene Mischung, die das mit Technetium markierte Protein enthält, einer Reinigung unterwirft, welche die Eliminierung eventueller Abbau-produkte dieses Proteins sowie des nicht-fixierten Technetiums erlaubt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reduktion des Pertechmetats bei einem pH-Wert in der Größenordnung von 11,6 durchführt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung darin besteht, daß man die Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 100 000 von dem Protein abtrennt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung darin besteht, daß man die Substanzen mit einem Molekulargewicht von weniger als 300 000 von der Mischung abtrennt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reinigung darin besteht, daß man zuerst das freie Technetium und das an Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 100 000 gebundene Technetium und an-

609847/1013

schließlich die Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 300000 eliminiert.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung eine geeignete Membran passieren läßt, die den Durchgang der von der Mischung abzutrennenden Substanzen erlaubt.

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man das in physiologischem Serum enthaltende Pertechnetat durch Zugabe einer Lösung von Essigsäure und Zinn(II)chlorid als Reduktionsmittel und anschließende Zugabe einer Alkalibase, um den pH-Wert auf den gewünschten Wert zu bringen, reduziert.

8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man ein injizierbares Fibrinogen menschlichen Ursprungs verwendet.

9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man ein mit Alkalisalzen assoziiertes lyophilisiertes Fibrinogen verwendet, dieses Fibrinogen in Wasser löst, diese Fibrinogenlösung dialysiert, um die Alkalisalze zu entfernen, und die das Fibrinogen und das reduzierte Pertechnetat enthaltende Mischung auf einen pH-Wert zwischen 7 und 8 bringt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung auf einen pH-Wert in der Größenordnung von 7,4 bringt.

11. Verfahren nach Anspruch 9 und/oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß man den pH-Wert der Mischung durch Zugabe einer wäßrigen Lösung von Natriumcitrat und Zitronensäure auf den gewünschten Wert bringt.

609847/1013

12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man mit Alkalisalzen assoziiertes lyophilisiertes Fibrinogen verwendet, dieses Fibrinogen in Wasser löst und die das Fibrinogen und das reduzierte Per-technetat enthaltende Mischung auf einen pH-Wert zwischen 7 und 8 bringt.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung auf einen pH-Wert in der Größenordnung von 7,4 bringt.
14. Verfahren nach Anspruch 12 und/oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß man den pH-Wert der Mischung durch Zugabe einer wäßrigen Lösung von Natriumcitrat und Zitronensäure auf den gewünschten Wert bringt.
15. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man vor der angegebenen Reinigung die kolloidalen Substanzen und/oder Niederschläge, die gegebenenfalls während der Absenkung des pH-Wertes der Mischung auftreten, abtrennt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung durch ein geeignetes Filter laufen läßt, welches die von der Mischung abzutrennenden Substanzen zurückhält.
17. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 12 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man die Markierung von Fibrinogen unter einer Stickstoffatmosphäre durchführt.
18. Injizierbare Lösung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens ein Protein aus der Gruppe Fibrinogen und der Immunoglobuline enthält, das mittels Technetium 99^m markiert und nach dem Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 17 hergestellt worden ist.

2621311

-21-

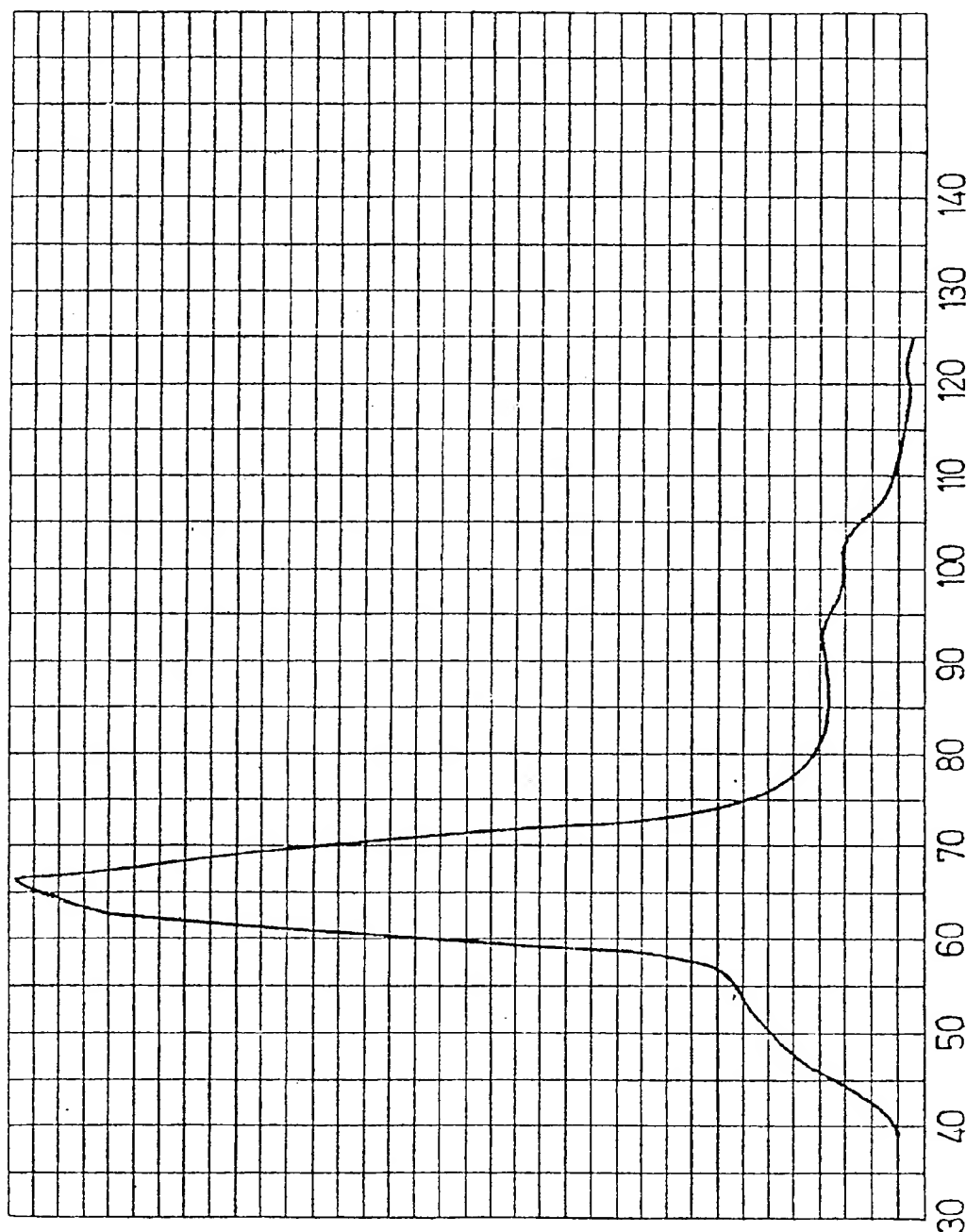


FIG.1

C07G

7-04

AT:13.05.1976

OT:18.11.1976

609847/1013

ORIGINAL INSPECTED

- 18 -

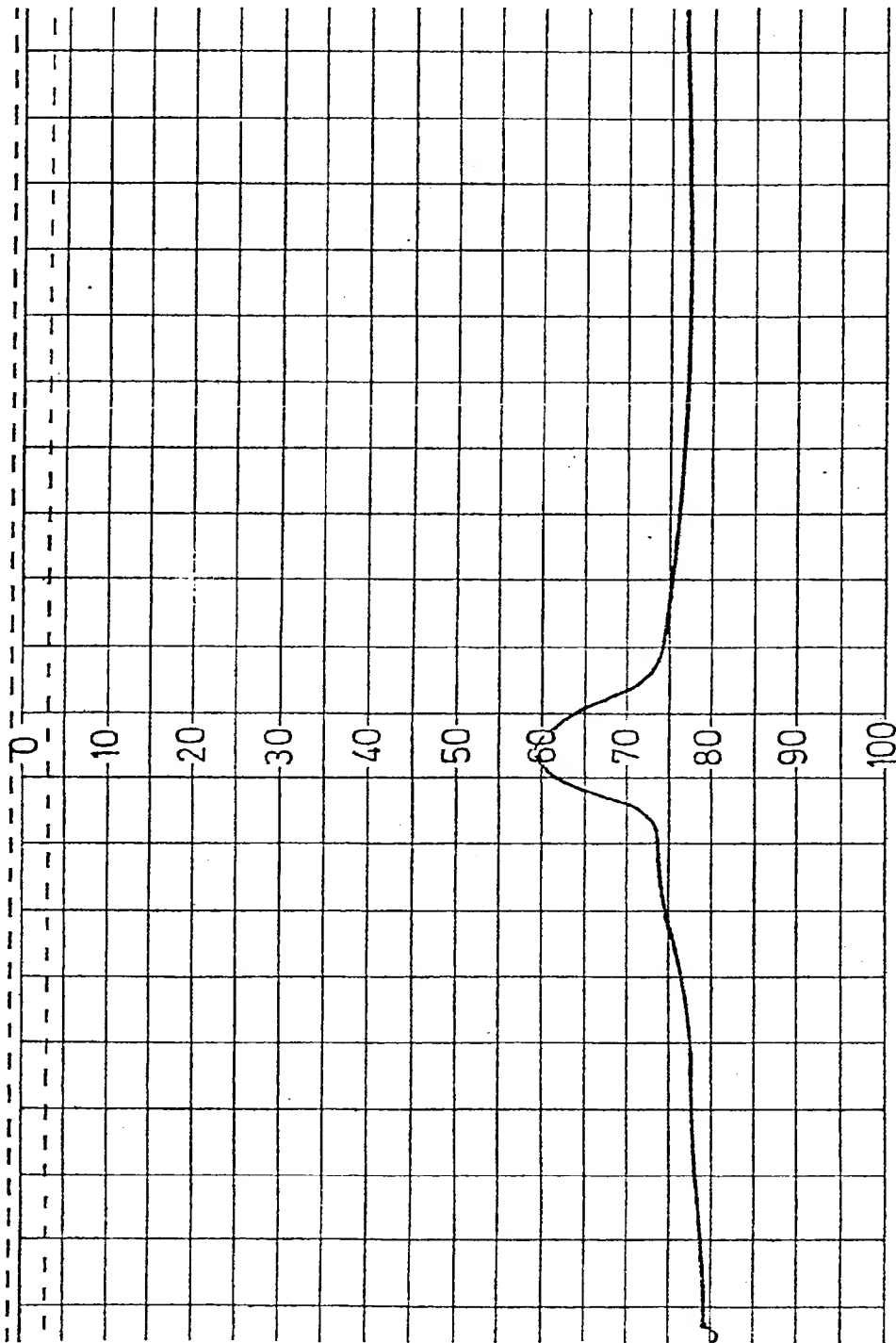
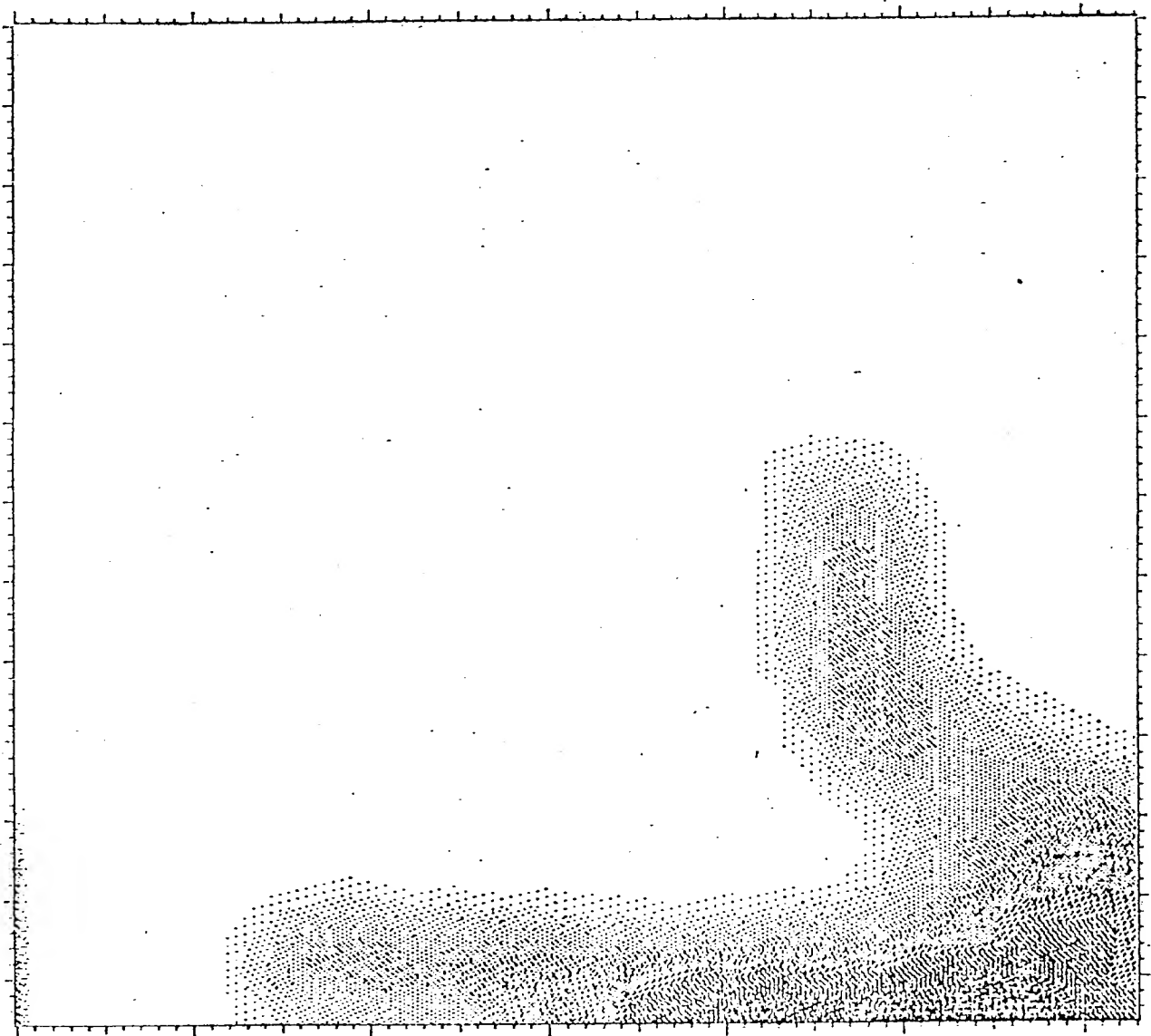


FIG. 2

609847/1013

-19-

FIG.3.

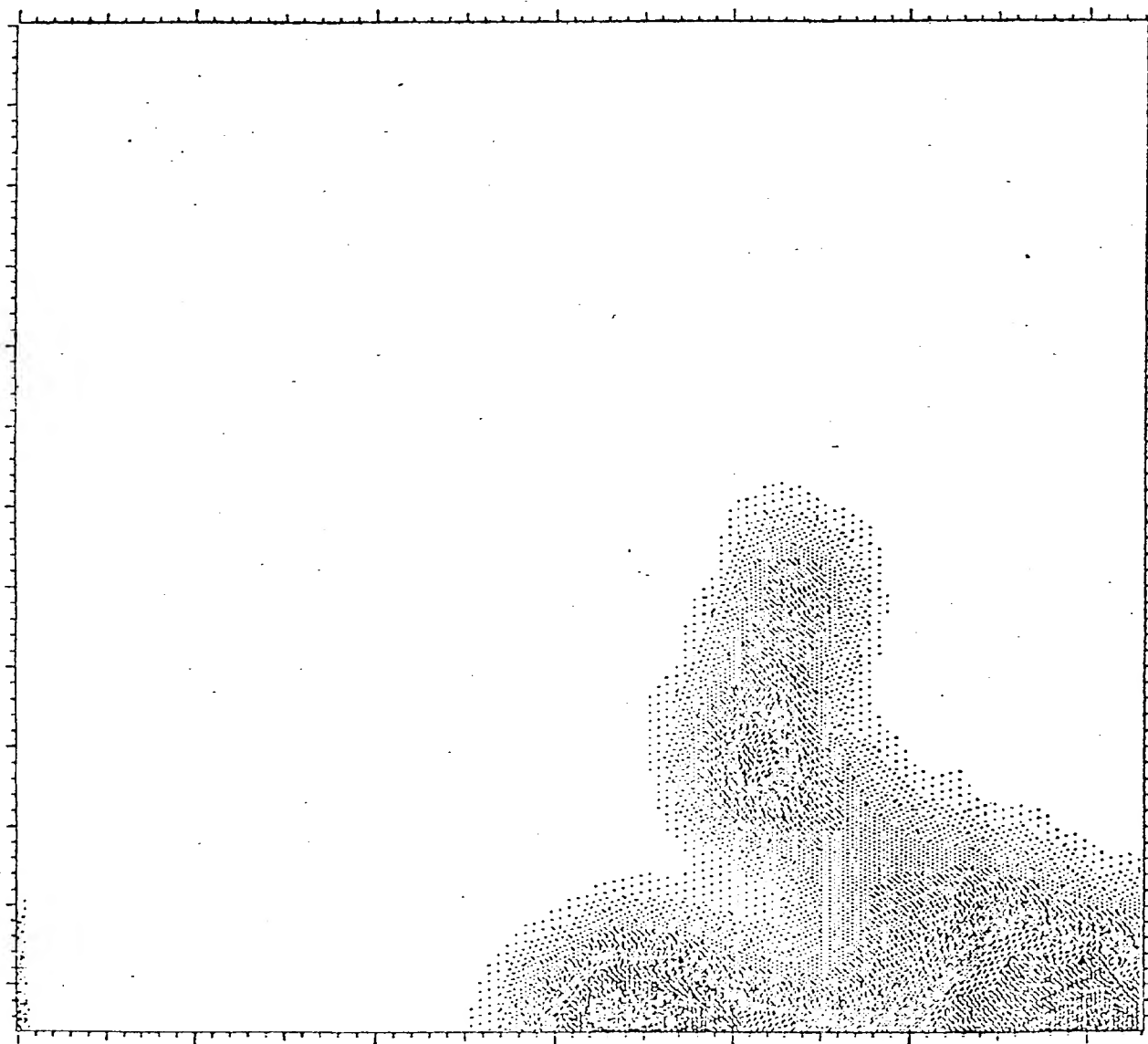


609847/1013

2621311

- 20 -

FIG. 4.



609847/1013